

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

Josip Rešetar

7186/N

KONSTRUKCIJA PLAZMIDNOG VEKTORA ZA TRANSFORMACIJU KVASCA *Pichia pastoris*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biokemija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za biokemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija**

Konstrukcija plazmidnog vektora za transformaciju kvasca *Pichia pastoris*

Josip Rešetar, 0108078540

Sažetak: *Pichia pastoris* često je korišten mikroorganizam u biotehnološkoj proizvodnji heterolognih proteina. Zbog mogućnosti rasta do visokih staničnih gustoća važna je mogućnost njegove primjene u dobivanju kemikalija na ekološki prihvatljiv i ekonomski isplativ način. U ovom radu konstruiran je plazmidni vektor pogodan za transformaciju kvasca *Pichia pastoris* koji nosi gen za rekombinantni protein Ccw12XR iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Rekombinantni gen se sastoji od dijela koji kodira za enzim ksiloza reduktazu (XR) i dijela koji kodira za protein Ccw12 stanične stijenke kvasca *S. cerevisiae*. Rekombinantni gen umnožen je PCR metodom i ugrađen TA ligacijom u plazmidni vektor pGEM®-T Easy. Plazmid je umnožen u kompetentnim stanicama *E. coli*, nakon čega je iz plazmida izrezan rekombinantni gen *CCW12XR* korištenjem SapI restrikcijskog enzima. Naposljetku je *CCW12XR* gen ligiran s lineariziranim plazmidom pBSY3Z. Uspješnost ligacije je, nakon umnažanja plazmidnog vektora u kompetentnim stanicama *E. coli*, provjerena restrikcijom pomoću odabranih restrikcijskih enzima i elektroforezom na agaroznom gelu.

Ključne riječi: *CCW12XR*, ksiloza reduktaza, *Pichia pastoris*, plazmidni vektor

Rad sadrži: 33 stranice, 13 slika, 9 tablica, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan u elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Renata Teparić

Datum obrane: 16.7.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Construction of shuttle vector for the transformation of yeast *Pichia pastoris*

Josip Rešetar, 0108078540

Abstract: *Pichia pastoris* is a commonly used host in the biotechnological production of heterologous proteins. Since it can grow to very high cell densities, *Pichia pastoris* is applicable in the eco-friendly and economical production of chemicals. This thesis describes the construction of the shuttle vector, suitable for transformation of *Pichia pastoris* carrying the gene for the Ccw12XR recombinant protein from *Saccharomyces cerevisiae*. The recombinant gene encodes both the xylose reductase (XR) and the Ccw12 cell wall protein of *S. cerevisiae*. The recombinant gene is amplified using PCR and ligated into pGEM®-T Easy. The plasmid is replicated in competent *Escherichia coli* cells, following which the recombinant *CCW12XR* gene is restricted from the constructed plasmid using SapI. The isolated *CCW12XR* gene is then ligated with the linearized pBSY3Z plasmid. Finally, following the replication of the shuttle vector in competent *E. coli* cells, the ligation efficiency is verified via restriction analysis and DNA electrophoresis.

Keywords: *CCW12XR*, *Pichia pastoris*, shuttle vector, xylose reductase

Thesis contains: 33 pages, 13 figures, 9 tables, 40 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph. D. Renata Teparić, Associate Professor

Defence date: 16.7.2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Vrste plazmidnih vektora i mehanizmi kloniranja	2
2.1.1. Integrativni plazmidi	3
2.1.2. Epizomalni plazmidi	4
2.1.3. Centromerni plazmidi	5
2.2. Promotori	5
2.2.1. Inducibilni promotori	7
2.2.2. Konstitutivni promotori	8
2.3. Selektivni biljezi	8
2.4. Kvasac <i>Pichia pastoris</i>	9
2.4.1. Metabolizam ksiloze putem rekombinantne ksiloza reduktaze	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije	12
3.1.2. Uređaji	12
3.1.3. Oligonukleotidne početnice	13
3.1.4. Plazmidi	13
3.1.4.1. pBSY3Z	13
3.1.4.2. pGEM®-T Easy	14
3.1.5. <i>CCW12XR</i> PCR fragment	15
3.1.6. Soj bakterije	15
3.1.7. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)	16
3.2.2. Umnažanje <i>CCW12XR</i> fragmenta iz pRS425 plazmida primjenom PCR-a	18
3.2.3. Pročišćavanje fragmenta umnoženog PCR metodom	19
3.2.4. DNA elektroforeza u agaroznom gelu	19
3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela	19
3.2.6. Određivanje koncentracije fragmenta pomoću Qubit-a	19
3.2.7. TA ligacija <i>CCW12XR</i> fragmenta s lineariziranim plazmidom pGEM®-T Easy	20
3.2.8. Transformacija kompetentnih stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	21

3.2.9. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije <i>Escherichia coli</i>	21
3.2.10. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima	21
3.2.11. Ligacija <i>CCW12XR</i> fragmenta s plazmidom pBSY3Z	22
4. REZULTATI	23
4.1. Kloniranje <i>CCW12XR</i> fragmenta primjenom PCR metode	23
4.2. Restrikcija pGEM®-T Easy plazmida i linearizacija pBSY3Z plazmida.....	23
4.3. Izolacija <i>CCW12XR</i> fragmenta i fragmenta pBSY3Z plazmida iz agaroznog gela i njihova ligacija u plazmidni vektor pogodan za transformaciju kvasca <i>Pichia pastoris</i>	25
5. RASPRAVA	27
6. ZAKLJUČCI	29
7. LITERATURA	30

1. UVOD

Kvasac *Pichia pastoris* je metilotrofni askomicetni kvasac koji pripada carstvu *Fungi*. Zahvaljujući brzom rastu i visokim prinosima na podlogama jeftinog sastava često se primjenjuje kao radni mikroorganizam u proizvodnji heterolognih proteina. Ekspresija proteina od interesa, osim soja korištenog kvasca, uvelike ovisi i o korištenim plazmidnim vektorima. Plazmidni vektori mogu biti integrativne, epizomalne ili centromerne prirode. Integrativni plazmidi najčešća su korištena vrsta plazmida za transformaciju *P. pastoris* koja ujedno daje i najbolje rezultate transformacije u ovom kvascu. Pri konstrukciji plazmidnih vektora važnu stavku predstavlja odabir pogodnih promotora, od kojih je najpoznatiji predstavnik inducibilnog tipa promotor alkohol oksidaze (P_{AOX1}), a konstitutivnog tipa promotor gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaze (P_{GAP}). Odabir transformiranih kolonija omogućen je primjenom selektivnih biljega, kod *P. pastoris* je to najčešće gena za rezistenciju na antibiotik, posebice bleomicinski zeocin i aminoglikozidni G418.

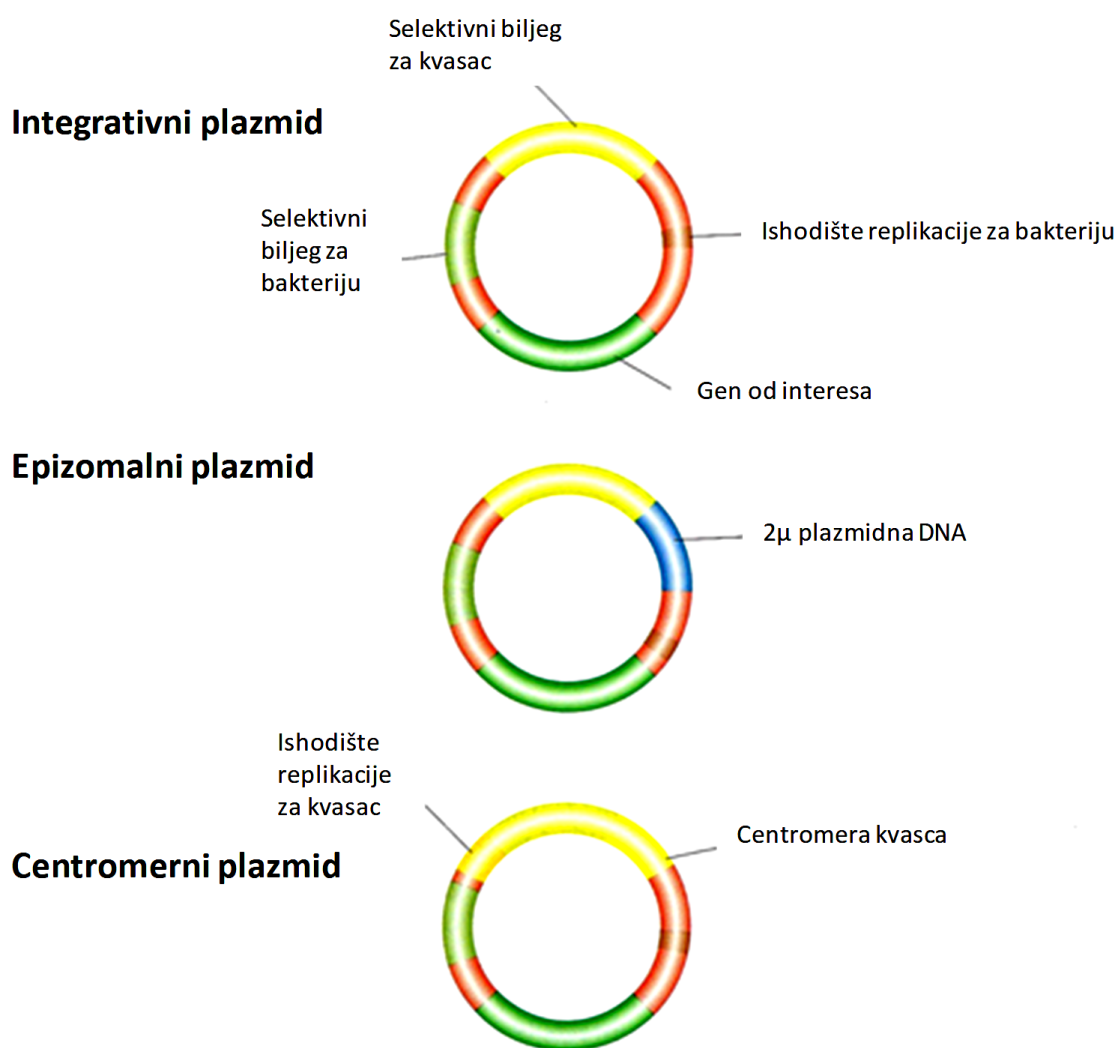
Ksiloza je sastavni dio celulozne biomase koja u novije vrijeme dobiva sve više pozornosti zbog moguće redukcije u ksilitol pomoću enzima ksiloza reduktaze. Biotehnološki put proizvodnje relativno skupog ksilitola osim što je iznimno isplativ ujedno je i ekološki prihvatljiv. Iako je ksiloza reduktaza prirodno prisutna u stanicama kvasca, zbog nedovoljne količine ksiloze koju kvasac može apsorbirati te zahtjevnog procesa pročišćavanja produkta reakcije, do sada nije ostvarena održiva biotehnološka proizvodnja. Shodno tome, nameće se potreba za genetičkim inženjeringom novih vektorskih plazmida kao i poboljšanjem postojećih sojeva radnog mikroorganizma.

Cilj ovog rada bila je konstrukcija plazmidnog vektora podesnog za transformaciju kvasca *P. pastoris* koji u svom sastavu sadrži gen koji kodira za heterolognu rekombinantnu ksiloza reduktazu. Pomoću PCR metode ostvarena je amplifikacija *CCW12XR* gena iz plazmida pRS425Ccw12XR koji je prilagođen ekspresiji u stanicama kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Amplificirani gen potom je ligiran s plazmidom pBSY3Z, a uspješnost ligacije provjerena je restrikcijskom analizom i gel elektroforezom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vrste plazmidnih vektora i mehanizmi kloniranja

Plazmidni vektori (*engl. shuttle vectors*) neophodan su alat u genetičkom proučavanju kvasaca. Oni omogućuju istovremeno kloniranje DNA sekvence od interesa u prokariotskom modelnom organizmu, primjerice *Escherichia coli*, i potom njen transfer u stanice eukariotskog modelnog organizma, primjerice *Pichia pastoris*, s ciljem ekspresije gena od interesa (Oldenburg i sur., 1997). Ovisno o načinu integracije u genom domaćina, plazmidni vektori se mogu podijeliti na integrativne (kromosomski) i neintegrativne (nekromosomski). Neintegrativni plazmidi dodatno se mogu podijeliti na epizomalne i centromerne vektorske plazmide (slika 1).



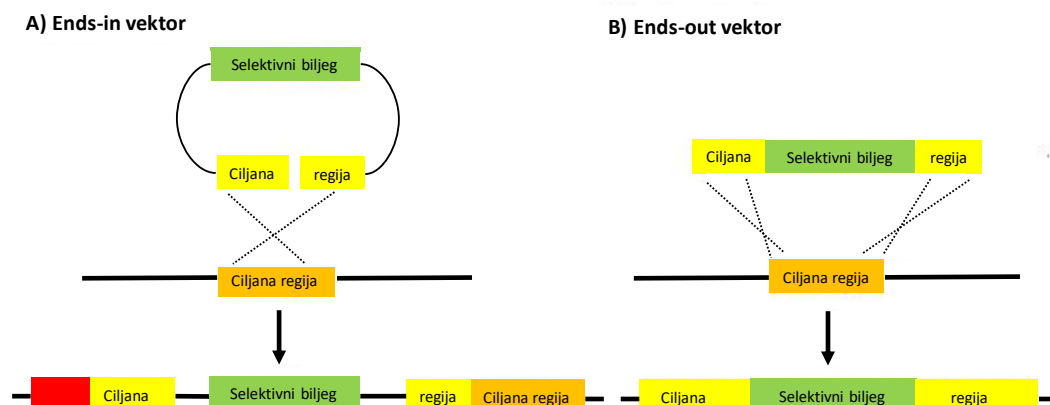
Slika 1. Shematski prikaz plazmidnih vektora s istaknutim razlikama u genetičkom profilu (http://www.cas.miamioh.edu/~wilsonkg/old/gene2005/manipulation/geneengineering/tools/tools_files/tech_apps.htm, pristupljeno 23.6.2018.)

2.1.1. Integrativni plazmidi

Integrativni plazmidi dobili su naziv po svojstvu integracije u genom domaćina putem homologne rekombinacije zbog nepostojanja sekvence za ishodište replikacije u stanicama kvasca (tzv. *ori* sekvence) (Kowalczykowski, 2015). Prije samog procesa transformacije, integrativni plazmid se linearizira primjenom odgovarajućeg restrikcijskog enzima što povećava učinkovitost transformacije, ali i determinira integracijska mjesta na lineariziranom plazmidu (Orr-Weaver i sur., 1983). Važno je istaknuti da se transformacija kvasca *Pichia pastoris* odvija najčešće primjenom integrativnih plazmida.

Integracija lineariziranog plazmida ostvaruje se popravkom dvolančanog loma homolognom rekombinacijom. Nakon komplementarnog sparivanja s ciljnom regijom u genomu, krajevi plazmida su okrenuti jedni prema drugima i zato se ovaj pristup zove rekombinacija unutra („ends-in“). Integracija je posljedica razrješavanja rekombinacijskog intermedijera uz crossing-over i pri integraciji dolazi do duplikacije ciljne sekvence (Rothstein, 1991). Ovakav proces izrazito je uspješan i moguć čak ukoliko se na krajevima nalaze kratke heterologne sekvence, koje će prije integracije u genom ukloniti proteini koji sudjeluju u homolognoj rekombinaciji (Svetec i sur., 2007).

Linearizirani fragmenti DNA mogu, zahvaljujući procesu homologne rekombinacije, i zamijeniti ciljnu regiju u genomu. Nakon sparivanja s homolognom regijom, krajevi ovakvih fragmenata okrenuti su jedan od drugog pa se ovakva rekombinacija zove i krajevi-van („ends-out“), a do zamjene ciljne regije transformirajućom dolazi dvostrukim crossing-overom. Kako rekombinacijom „ends-out“ ne dolazi do duplikacije ciljne regije, sojevi koji su modificirani na ovaj način imaju veću mitotičku stabilnost. Mehanizmi „ends-in“ i „ends-out“ rekombinacija prikazani su na slici 2.



Slika 2. Tipovi integracije linearnih DNA sekvenci („ends-in“ i „ends-out“). Žuto obojena ciljana regija homologna je narančastoj ciljanoj regiji, dok ukrižene isprekidane linije predstavljaju crossing-over događaje (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.femsre.2003.10.002> , pristupljeno 23.6.2018.)

2.1.2. Epizomalni plazmidi

Epizomalni plazmidi vuku naziv od pojma episom, kojeg su još davne 1958. godine prvi upotrijebili znanstvenici Jacob i Wollman (Morange, 2009). U kontekstu eukariotskih organizama, kojima pripadaju i kvasci, epizomalni plazmidi predstavljaju neintegrativne ekstrakromosomske kružne DNA molekule koje se mogu autonomno replicirati (Romanos i sur., 1992).

Epizomalni vektori u svom sastavu, kao izvankromosomske replikatore, posjeduju autonomne replikacijske sekvence (tzv. *ARS* sekvence) ili pak native 2μ plazmidne vektore prisutne u rodu *Saccharomyces*. *ARS* vektori su prisutni u više kopija unutar stanice, međutim odlikuju se visokom nestabilnošću i relativno niskom stopom genetičkog prijenosa na stanice kćeri uslijed procesa diobe (Murray i Szostak, 1983). Primjena *ARS* vektora zbog nestabilnosti je ograničena, a veću stabilnost moguće je ostvariti dodavanjem centromernih kvašćevih sekvenci što paralelno utječe na smanjenje broja kopija unutar stanice. S druge strane, 2μ plazmidni vektori najsličniji su bakterijskim plazmidima te se odlikuju visokom stabilnošću zbog čega su gotovo uvijek prvi izbor kada se razmatra manipulacija epizomalnim vektorima.

Više su od deset puta stabilniji u odnosu na *ARS* vektore te pokazuju niske genetičke gubitke s generacijskim diobama stanica (svega 1–3%).

Iako se za transformaciju kvasca *Pichia pastoris* dominantno koriste integrativne vrste plazmida, zabilježena je i primjena epizomalnih vrsta u svrhu ekspresije heterolognih proteina ili za pretraživanje knjižnica gena mutanta *Pichia pastoris* (Lee i sur., 2005; Uchima i sur., 2012).

2.1.3. Centromerni plazmidi

Centromerni plazmidi dobili su naziv po prisutnosti centromernih sekvenci unutar plazmida. U stanicama kvasca ponašaju se kao minijturni kromosomi koji koriste endogenu replikaciju stanica i kromosomske segregacijske alate te su mitotički stabilni u odsutnosti selektivnog pritiska.

Centromerni plazmidi sadrže dvije karakteristične sekvence: *ARS* sekvencu i centromernu sekvencu (*CEN* sekvencu), a obje sekvence moraju biti prisutne u plazmidu kako bi se održala stabilnost plazmida i pravilna raspodjela tijekom stanične diobe. Veličina centromernog plazmida također utječe na segregacijsku stabilnost na način da se veća veličina plazmida povezuje s manjom učestalošću pogrešnih distribucija tijekom staničnih dioba (Hieter i sur., 1985). Dodatno, ukoliko je u stanici domaćina istovremeno prisutno više vrsta centromernih plazmida, dolazi do međusobnog smanjenja segregacijske stabilnosti (Runge i sur., 1991).

Nakamura i sur. (2018) uspjeli su konstruirati centromerni plazmid unutar kojeg je korištena centromerna DNA sekvenca kromosoma 2 (*Cen2*) sa zabilježenom aktivnosti samostalne replikacije. Konstruirani centromerni plazmid pokazao je visoku učinkovitost i stabilnost u procesu transformacije *Pichia pastoris*.

2.2. Promotori

Promotor predstavlja genetičku sekvencu plazmida duljine 100 do 1000 baznih parova, na koju vezanjem RNA polimeraze zajedno sa specifičnim transkripcijskim faktorima započinje proces transkripcije. Promotori koji se koriste pri konstrukciji plazmidnog vektora mogu biti inducibilne ili pak konstitutivne prirode. Primjenom inducibilnih promotora, poput promotora alkohol oksidaze, ostvaruje se veća ekspresija proteina. S druge strane, konstitutivne promotore odlikuje lakše rukovanje i češće se primjenjuju u svrhu ekspresije selektivnih biljega.

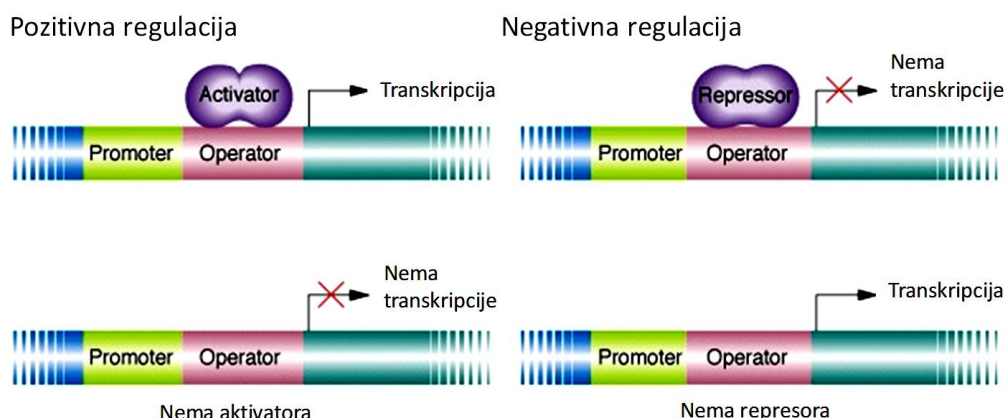
Detaljan pregled inducibilnih i konstitutivnih promotora koji se koriste za ekspresiju heterolognih proteina u kvascu *Pichia pastoris* dan je u tablici 1.

Tablica 1. Najčešće korišteni promotori za konstrukciju vektorskih plazmida u kvascu *Pichia pastoris*

Vrsta promotora	Odgovarajući gen	Regulacija	Izvor
Inducibilni	Alkohol oksidaza I (<i>AOX1</i>)	Inducibilan s metanolom	Tschopp i sur., 1987
	Dihidroksiaceton sintaza (<i>DAS</i>)	Inducibilan s metanolom	Ellis i sur., 1985; Tschopp i sur., 1987
	Formaldehid dehidrogenaza I (<i>FLD1</i>)	Inducibilan s metanolom ili metilaminom	Shen i sur., 1998
	Izocitrat liaza (<i>ICL1</i>)	Inducibilan u odsutnosti glukoze i/ili dodatkom etanola	Menendez i sur., 2003
	Na ⁺ /fosfat simporter (<i>PHO89</i>)	Indukcija u odsutnosti fosfata	Ahn i sur., 2009
	Biosintezni gen tiamina (<i>THI11</i>)	Represija tiaminom	Stadlmayr i sur., 2010
	Alkohol dehidrogenaza (<i>ADH1</i>)	Represija glukozom i metanolom; indukcija glicerolom i etanolom	Cregg i Tolstorukov, 2012
	Enolaza (<i>ENO1</i>)	Represija glukozom, metanolom i etanolom; indukcija glicerolom	Cregg i Tolstorukov, 2012
	Glicerol kinaza (<i>GUT1</i>)	Represija metanolom; indukcija glukozom, glicerolom i etanolom	Cregg i Tolstorukov, 2012
Konstitutivni	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (<i>GAP</i>)	Konstitutivna ekspresija na glukozu; manja ekspresija na metanolu i glicerolu	Waterham i sur., 1997
	Elongacijski faktor translacije 1 (<i>TEF1</i>)	Konstitutivna ekspresija na glukozu i glicerolu	Ahn i sur., 2007
	3-fosfoglicerat kinaza	Konstitutivna ekspresija na glukozu; manja ekspresija na metanolu i glicerolu	de Almeida i sur., 2005
	Glikozil fosfatidil inozitol usidreni protein (<i>GCW14</i>)	Konstitutivna ekspresija na glukozu, metanolu i glicerolu	Liang i sur., 2013
	Visokoafinitetni transporter glukoze (<i>G1</i>)	Represija na glicerolu; indukcija ograničenjem glukoze	Pielhofer i sur., 2013
	Aldehid dehidrogenaza (<i>G6</i>)	Represija na glicerolu; indukcija ograničenjem glukoze	Pielhofer i sur., 2013

2.2.1. Inducibilni promotori

Ekspresija inducibilnih promotora ovisna je o prisutnosti ili odsutnosti specifičnih biotičkih i abiotičkih čimbenika. Inducibilni promotori mogu biti regulirani pozitivnom ili pak negativnom kontrolom, zbog čega ih dijelimo na pozitivno inducibilne i negativno inducibilne. Kod pozitivno inducibilnih promotora, vezanju proteina aktivatora na regulacijsko mjesto na operonu prethodi vezanje inducibilnog čimbenika (*engl. inducer*) za protein aktivator. S druge strane, kod negativno inducibilnih promotora, vezanje inducibilnog čimbenika za represorski protein uzrokuje odvajanje represorske molekule čime je proces transkripcije aktiviran (slika 3).



Slika 3. Vrste regulacija ovisno o prirodi inducibilnih promotora

(http://www.bio.miami.edu/dana/250/250S12_11.html, pristupljeno 25.6.2018.)

S obzirom na prirodu čimbenika koji induciraju njihovu ekspresiju, inducibilni se promotori mogu dodatno podijeliti na kemijski inducibilne (inducirani kemijskim vrstama) te fizikalno inducibilne promotore (inducirani svjetlom, toplinom) pri čemu su kemijski inducibilni promotori znatno više u primjeni.

Inducibilni promotor alkohol oksidaze (P_{AOX1}) bio je prvi promotor korišten u konstrukciji plazmidnih vektora za ekspresiju heterolognih gena u kvascu *Pichia pastoris* koji i danas predstavlja najčešće korištenu vrstu inducibilnog promotora (Sigoillot i sur., 2012). Promotor alkohol oksidaze potpuno je aktivan jedino u prisutnosti metanola, dok prisutnost glukoze, glicerola ili etanola u podlozi djeluje represivno na aktivnost P_{AOX1} (Inan i Meagher, 2001). Budući da je metanol lako zapaljiva kemikalija, nepoželjna u fermentacijskim procesima visokih prinosa, znanstvenici su bili potaknuti na konstruiranje alternativnih inducibilnih

promotora ili pak modificiranog P_{AOX1} . Takagi i sur. (2008) opisali su metanol inducibilne promotore gena za metanol oksidazu (MOX) i format dehidrogenazu ($FMDH$) kod kojih je ekspresija inducirana bez dodatka metanola. Paralelno se javlja sve veći broj novih inducibilnih promotora koje odlikuju posebni regulacijski mehanizmi (Cregg i Tolstorukov, 2012). Iako je zabilježen porast novih promotora inducibilnog tipa, zbog ograničene ekspresije, i dalje je dominantna primjena široko korištenog $AOX1$ inducibilnog promotora.

2.2.2. Konstitutivni promotori

Konstitutivni promotori induciraju ekspresiju nizvodne kodirajuće sekvence neovisno o biotičkim i abiotičkim čimbenicima, zbog čega ih se još naziva nereguliranim ili kontinuirano aktivnim promotorima. Primjena konstitutivnih promotora olakšava procese genetičke manipulacije, isključuje korištenje opasnih inducibilnih kemijskih vrsta te osigurava kontinuiranu transkripciju gena od interesa. Kontinuirana transkripcija gena može biti poželjna iz više razloga: koekspresije pomoćnih proteina koji olakšavaju ekspresiju i sekreciju rekombinantnih proteina, osiguravanja posttranslacijskih modifikacija sintetiziranih proteina, utvrđivanja enzimatski kataliziranih kaskadnih koraka unutar metaboličkih puteva.

Konstitutivni promotor gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (P_{GAP}) najčešće je korišteni konstitutivni promotor u konstrukciji vektorskih plazmida namijenjenih transformaciji kvasca *Pichia pastoris*, kod kojeg prisutstvo glukoze u podlozi osigurava gotovo jednake razine ekspresije kao i kod P_{AOX1} (Waterham i sur., 1997). U novije vrijeme bilježi se porast konstitutivnih promotora (tablica 1), a kao rezultat istog konstruiran je $GCW14$ promotor koji se u razini ekspresije pokazao učinkovitijim u odnosu na konvencionalno korišteni P_{GAP} . (Liang i sur., 2013).

2.3. Selektivni biljezi

Gen integriran u genetički profil organizma domaćina, primjerice bakteriju ili kvasac, koji omogućuje provedbu prikladne selekcije organizama naziva se selektivnim biljegom. Selektivni biljeg najčešće predstavlja gen za rezistenciju na određeni antibiotik. Dodavanjem ciljanog antibiotika u podlogu provodi se selekcija među transformantima koji

posjeduju gen za rezistenciju i sukladno tome mogu preživjeti na podlozi, te stanicama koje ne posjeduju gen za rezistenciju pa na podlozi s antibiotikom vrlo brzo ugibaju. S obzirom na mehanizme provođenja selekcije, selektivni biljezi mogu biti pozitivni i negativni. Kada govorimo o provođenju selekcije pomoću selektivnih biljega najčešće podrazumijevamo pozitivni oblik selekcije kod kojeg se selekcija vrši s obzirom na sposobnost organizma da preživi na podlozi s antibiotikom ili pak nedostatkom određene konstitutivne molekule (pozitivna auksotrofna selekcija). S druge strane, negativna selekcija se provodi pomoću negativnih selektivnih biljega koji imaju za cilj parcijalno inhibirati ili u potpunosti zaustaviti rast organizma domaćina ubrzo nakon selekcije.

Usprkos dobro razvijenim genetičkim tehnikama u manipulaciji kvasca *Pichia pastoris*, tek je nekoliko selektivnih biljega opisano kao poželjnih u konstrukciji plazmidnih vektora. Dominantni biljezi koji se koriste u svrhu selekcije transformanata i odabira sojeva sa sposobnošću visoke razine produkcije su: *Sh ble* gen izoliran iz bakterije *Streptoalloteichus hindustanus* koji nosi rezistenciju na bleomicinski antibiotik zeocin te *BSD* gen izoliran iz bakterije *Streptomyces griseochromogenes* koji nosi rezistenciju na antibiotik blasticidin S (Romanos i sur., 1991; Higgins i sur., 1998). Dva dodatna selektivna biljega koja se mogu koristiti u svrhu generiranja sojeva visoke produkcije su gen *FLD1* iz *P. pastoris* koji iskazuje rezistenciju na formaldehid i gen *kan^r* iz bakterije *Streptomyces kanamyceticus* koji iskazuje rezistenciju na visoke koncentracije aminoglikozidnog antibiotika G418 (kanamicin) (Clare i sur., 1991).

2.4. Kvasac *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ili *Komagataella pastoris* je askomicetni metilotrofni kvasac iz porodice *Saccharomycetaceae*. Prvi puta ga je izolirao francuski botaničar Alexandre Guilliermond sa stabla kestena i opisao kao *Zygosaccharomyces pastori* (Guilliermond, 1920), kojeg su znanstvenici nakon boljeg uvida u procese razmnožavanja i formiranja spora ubrzo taksonomski preklasificirali u *Saccharomyces pastori*. Pedesetih godina dvadesetog stoljeća, američki ekolog Herman Phaff izolirao je identičan kvasac sa stabla hrasta kojem je dodijelio

taksonomski naziv *Pichia pastoris* (Phaff i sur., 1956). Budući da Phaff u to vrijeme nije posjedovao tehnologiju kojom bi mogao potvrditi da je izolirani kvasac taksonomski identičan kvascu izoliranom od strane Guilliermonda, dogovorno je prihvaćeno da se dvije vrste izolirane na relativno udaljenim krajevima svijeta taksonomski svrstaju u samo jednu, *Pichia pastoris*.

Industrijska primjena *Pichia pastoris* započela je 70-ih godina 20. stoljeća kada su metilotrofna svojstva kvasca korištena u svrhu proizvodnje pojedinačnih staničnih proteina (SCP, *engl. single cell protein*) namijenjenih obogaćivanju konvencionalne stočne hrane. Zbog naftne krize 1973. godine, došlo je do drastičnog porasta cijene metanola što je proizvodnju SCP pomoću *Pichia pastoris* kao radnog mikroorganizma činilo ekonomski neisplativom. Zaokret u industrijskoj primjeni *Pichia pastoris* događa se već 80-ih godina 20. stoljeća kada se kvasac počinje koristiti u svrhu proizvodnje heterolognih proteina (Cregg i sur., 1985), što mu je do danas ostala najvažnija industrijska uloga.

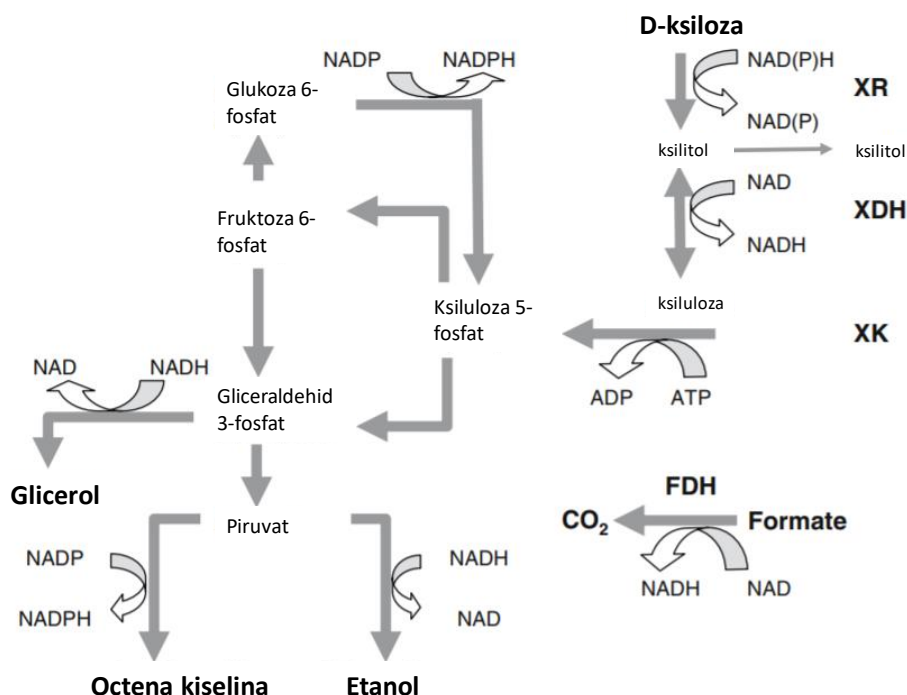
Pichia pastoris kao radni mikroorganizam izrazito je sličan dobro istraženom i ispitanom kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Oba kvasca se koriste u proizvodnji topljivih i membranskih proteina, imaju slične parametre rasta i vrše posttranslacijsko formiranje disulfidnih mostova i glikolizaciju koji su ključni za pravilnu funkciju nekih rekombinantnih proteina (Darby i sur., 2012). Dvije prednosti s industrijskog aspekta koje *Pichia pastoris* ima nad *Saccharomyces cerevisiae* su: mogućnost rasta na alkoholu metanolu kao jeftinom izvoru energije te rast do visokih staničnih gustoća čime se ostvaruje znatno veća proizvodnja željenog heterolognog proteina (Ahmad i sur., 2014).

2.4.1. Metabolizam ksiloze putem rekombinantne ksiloza reduktaze

Ekspresija heterolognih proteina na površini mikroorganizama u posljednjih nekoliko godina otvara novi aspekt biotehnološke proizvodnje, pa je fokus istraživanja na ekspresijskim sustavima mikrobnih stanica. Primjena heterolognih proteina u proizvodnji ima veliki potencijal za ostvarenje napretka u proizvodnji kemikalija, deterdženata, hrane, kao i u medicinskoj dijagnostici (Teparić i sur., 2010.). Paralelna kriza energenata i sve veći ekološki zahtjevi svrstavaju celuloznu biomasu, bogatu ksilozom, na listu poželjnih obnovljivih sirovina za dobivanje biogoriva i kemikalija poput etanola, ksilitola, mliječne kiseline i drugih organskih kiselina (Li i sur., 2015).

Metabolizam ksiloze dio je puta pentoza-fosfata prisutnog u kvascima koji se

temelji na D-ksilozno-inducibilnom enzimatskom sustavu. Postoje dva metabolička puta u koje se ksiloza može uključiti – oksidoreduktazni i izomerazni (Webb i Lee, 1990). Većina kvasaca koristi oksidoreduktazni metabolički put (slika 4) koji se temelji na prisustvu ksiloza reduktaze (XR) i ksiloza dehidrogenaze (XDH), dok je izomerazni metabolički put pretežito zastupljen kod bakterija koje posjeduju enzim ksiloza izomerazu.



Slika 4. Metabolički put ksiloze u stanicama kvasca (Granstörn i sur., 2007)

Ksiloza reduktaza pripada superobitelji enzima 2b aldo-keto reduktaza. Ima ulogu u reverzibilnoj reakciji redukcije ksiloze u ksilitol za što joj je potreban NADPH kao kofaktor. Pokazano je da ksiloza reduktaza nekih organizama kao kofaktor može koristiti i NADH, što je važno svojstvo kod anaerobnog oblika fermentacije (Bruinenberg i sur., 1984).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali**3.1.1. Kemikalije**

- agaroz - Sigma-Aldrich Life Science (St. Louis, Missouri, SAD)
- kvašček ekstrakt, baktotripton – Biolife (Milano, Italija)
- λ DNA standard za elektroforezu (pocijepana sa HindIII) (New England Biolabs)
- restrikcijski enzimi: EcoRV, SapI, BamHI, PvuII, SacI (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- Taq polimeraza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- T4 DNA ligaza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD)
- zeocin – InvivoGen (Toulouse, Francuska)
- ampicilin – Roth (Karlsruhe, Njemačka),
- TAE pufer (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA)
- kit za izolaciju plazmida iz stanica *E.coli* NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- kit za izolaciju DNA iz gela i pročišćavanje fragmenata umnoženih PCR-om NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)

Ostale kemikalije su analitičke čistoće također i nabavljene od uobičajenih dobavljača.

3.1.2. Uređaji

- transiluminator (Hoefer, Macrovue UVis-20)
- uređaj za PCR (Labnet)
- kadica za elektroforezu DNA (Biorad)
- izvor napajanja za kadicu za elektroforezu (SX250 MightySlim, Hoefer)
- termoblok (Bio TDB-100, BioSan)
- centrifuga (Centric 150, Tehnica)
- termostatirana tresilica za uzgoj bakterijskih kultura (KS 4000, IKA)
- električna grijalica (Techno, Kartell)
- Qubit 4 fluorometar (ThermoFischer)

3.1.3. Oligonukleotidne početnice

Oligonukleotidne početnice korištene za umnažanje *CCW12XR* gena iz plazmida pRS425Ccw12XR PCR metodom prikazane su u tablici 2.

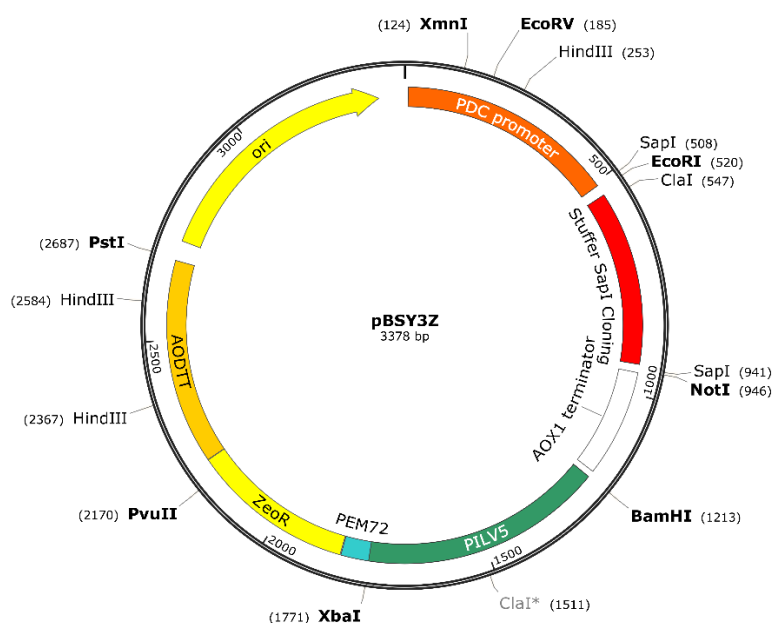
Tablica 2. Primeri (oligonukleotidne početnice) korišteni za umnažanje *CCW12XR* gena

Početnica	Sekvenca
Ccw12XR Pichia F	CCGTACGGCTCTTCCATGCAATTTTCTACTGTCGC
Ccw12XR Pichia R	GCCGCTTATGAAGAGCCTGGAGCTCTCCG

3.1.4. Plazmidi

3.1.4.1. pBSY3Z

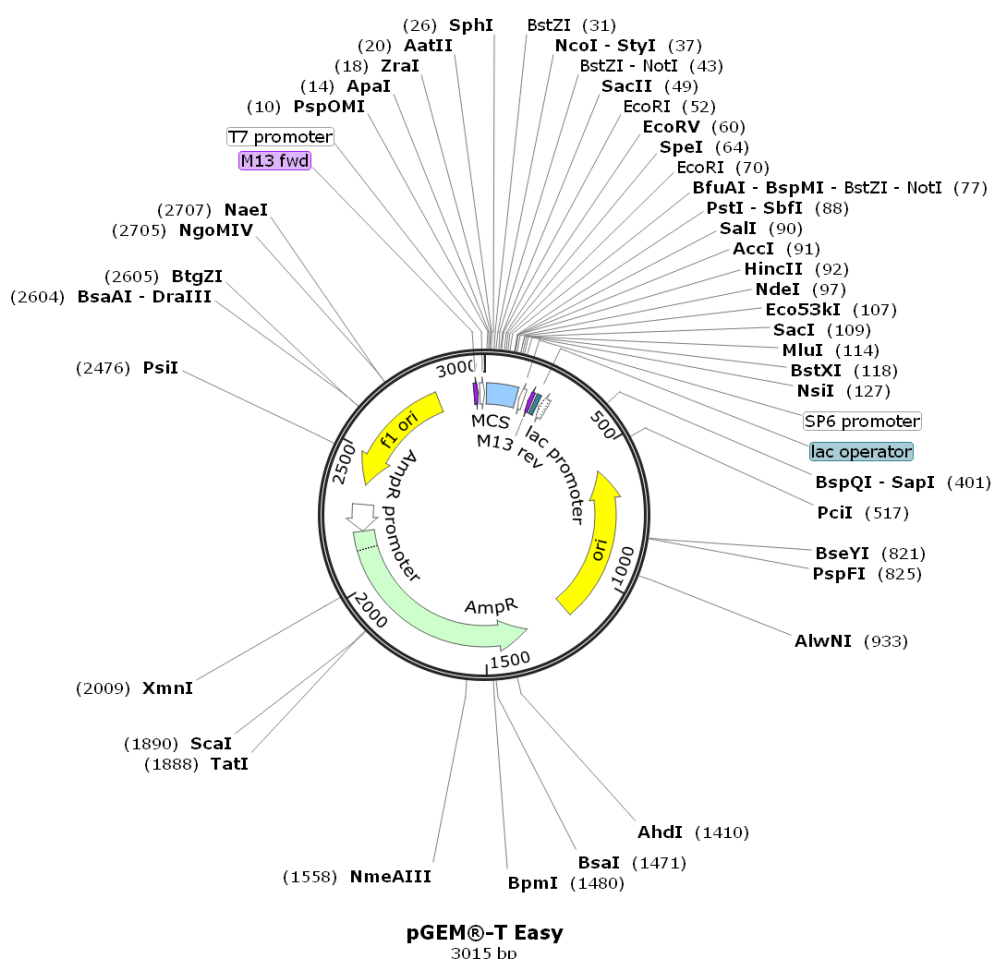
U eksperimentalnom dijelu ovoga rada kao vektorski sistem korišten je plazmid pBSY3Z (slika 5). Plazmid sadrži *ori* ishodište (*engl. origin of replication*) koje mu omogućava samostalnu replikaciju unutar bakterije domaćina. Kao bakterija domaćin najčešće se koristi *Escherichia coli*. *PDC* promotor kontrolira ekspresiju gena *CCW12XR*, a završetak transkripcije osiguran je prisustvom *AOX1* terminatora. Nadalje, u plazmidu je prisutan i gen za rezistenciju na zeocin, antibiotik iz skupine bleomicina, koji se koristi kod selekcije transformiranih bakterijskih stanica na hranjivim podlogama sa zeocinom.



Slika 5. Genetička mapa plazmida pBSY3Z

3.1.4.2. pGEM®-T Easy

pGEM®-T Easy (slika 6) je linearizirani vektor koji se koristi za TA ligaciju s fragmentom deoksiribonukleinske kiseline dobivenim PCR metodom. Naime, linearizirani vektor na svojim 3' krajevima sadrži nesparene baze timidina koji su pogodni za kohezivnu ligaciju s PCR fragmentom koji na svojim krajevima sadrži nesparene baze adenina. MCS (*engl. Multiple cloning site*) regija, odnosno polilinker, karakteristična je po zastupljenosti velikog broja restrikcijskih mjesta čime je osigurana linearizacija s različitim vrstama restrikcijskih enzima. Unutar plazmida je prisutan i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, koji kodira za enzim β -laktamaz, čime je omogućena selekcija bakterijskih transformanata na hranjivoj podlozi s ampicilinom. Ostale dijelove plazmida čime *f1 ori* i *ori* ishodišta replikacije te promotori *lac*, *AmpR* *SP6* i *T7*.

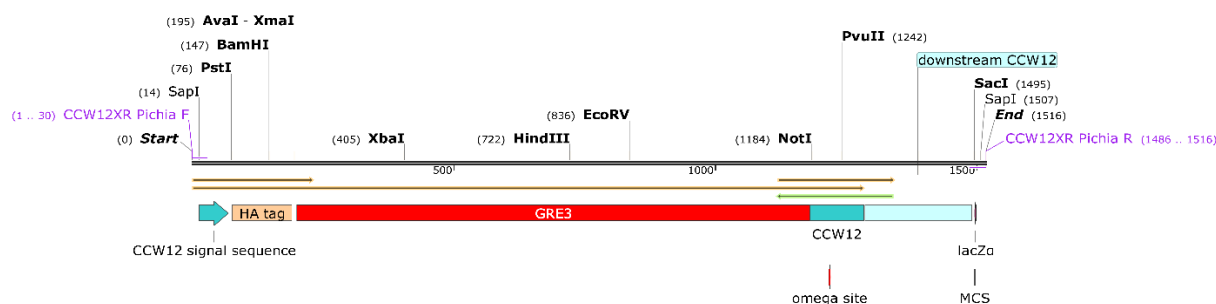


Slika 6. Genetička mapa plazmida pGEM®-T Easy

(http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/basic_cloning_vectors/pGEM-T_Easy/, pristupljeno: 10.5.2018.)

3.1.5. *CCW12XR* PCR fragment

CCW12XR fragment dobiven je u velikom broju kopija primjenom PCR metode korištenjem plazmida pRS425Ccw12XR kao kalupa. Rekombinantni gen sastoji se od: *GRE3* gena koji kodira za enzim ksiloza reduktaze, dijela *CCW12* gena koji kodira za ekspresiju kovalentno vezanog proteina stanične stijenke Ccw12 te hemaglutininske oznake (*engl. HA tag*) koja omogućava detekciju i pročišćavanje eksprimiranog rekombinantnog proteina (slika 7).



Slika 7. Sastav *CCW12XR* fragmenta umnoženog PCR metodom

3.1.6. Soj bakterije

E. coli koja je korištena za transformaciju ima genotip: DH5 α F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 (Life Technologies).

3.1.7. Hranjiva podloga za uzgoj bakterija

Za uzgoj bakterija korištena je kruta i tekuća LB podloga. Tekuća podloga sadržavala je kvašćev ekstrakt ($\varphi = 0,005$), baktotripton ($\varphi = 0,01$), NaCl ($\varphi = 0,005$), a kruta baktotripton ($\varphi = 0,01$), kvašćev ekstrakt ($\varphi = 0,005$), NaCl ($\varphi = 0,005$) i agar ($\varphi = 0,016$). Krute i tekuće LB podloge dodatno su sadržavale antibiotik zeocin u koncentraciji od 25 $\mu\text{g/mL}$ u slučaju uzgoja bakterija s pBSY3Z plazmidom ili pak antibiotik ampicilin u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ u slučaju uzgoja bakterija s TA plazmidom.

3.2. Metode

3.2.1. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR, *engl. Polymerase chain reaction*) je metoda koja se zasniva na umnažanju određenog segmenta DNA molekule u *in vitro* uvjetima. Metodu je 1983. godine otkrio znanstvenik Karry Mullis, koji je za istoimeno otkriće zajedno sa znanstvenikom Michaelom Smithom podijelio Nobelovu nagradu iz područja kemije 1993. godine. PCR danas predstavlja tehniku široko primjenjivanu u različitim znanstvenim područjima pomoću koje je u relativno kratkom vremenu moguće dobiti višemilijunski broj kopija specifičnog dijela DNA. PCR metoda provodi se u uređaju *Thermocycler* koji je dobio ime po sposobnosti brzog cikličkog zagrijavanja i hlađenja PCR smjese (slika 8). Uređaj ostvaruje brzu promjenu temperature reakcijske smjese jednostavnom promjenom jakosti struje na kontaktnoj ploči, što se opisuje termoelektričnim Peltierovim efektom. PCR smjesa se sastoji od DNA molekule sa sekvencom od interesa, odgovarajućih početnica, termostabilne DNA polimeraze (*Taq* polimeraza), pufera za DNA polimerazu te smjese nukleotida (dNTP). Uobičajeni volumen PCR reakcijske smjese nalazi se u rasponu od 10 – 200 μL .

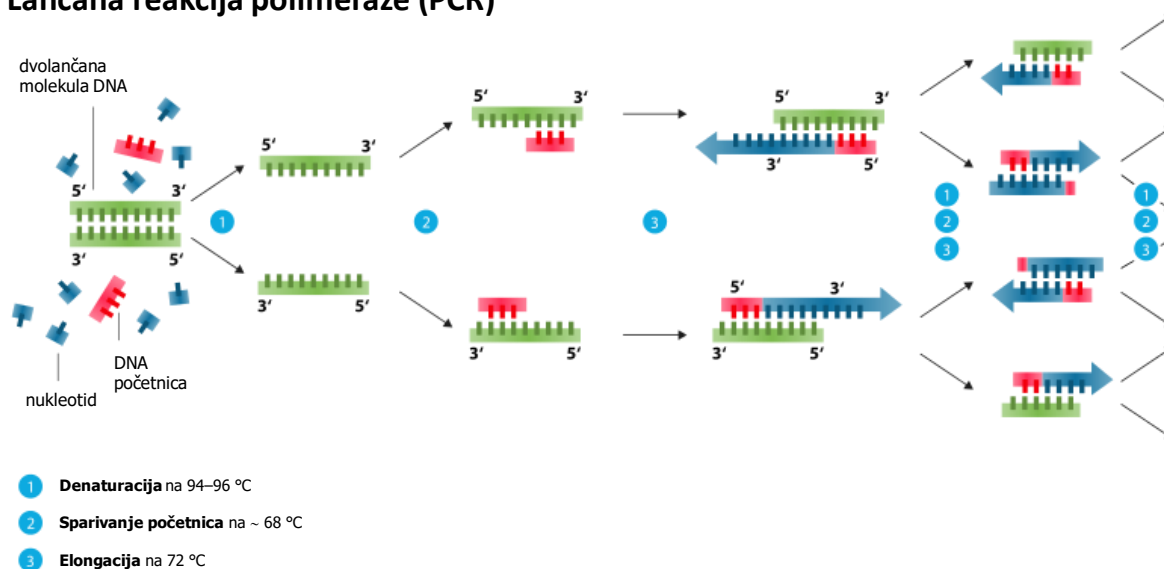


Slika 8. Uređaj za provedbu lančane reakcije polimeraze (PCR) (*Thermocycler*)

Standardna PCR metoda sastoji se od 3 koraka koja se ciklički ponavljaju: denaturacije DNA molekule, sparivanja oligonukleotidnih početnica s lancom kalupom te produljenja početnica djelovanjem DNA polimeraze (slika 9).

U prvom koraku, denaturaciji DNA molekule, dolazi do pucanja međulančanih vodikovih veza unutar DNA uslijed zagrijavanja na temperaturi od 95 °C. Posljedično dolazi do odvajanja DNA lanaca, pri čemu svaki lanac služi kao kalup za umnažanje ciljanog PCR fragmenta. Po završetku prvog koraka slijedi hlađenje PCR smjese na 50 – 70 °C čime se omogućuje kovalentno sparivanje oligonukleotidnih početnica s lancom kalupom. Točna vrijednost temperature pri kojoj dolazi do povezivanja početnice s DNA kalupom (*engl. annealing temperature*) ovisi o duljini same početnice i zastupljenosti GC nukleotida. U završnom, trećem, koraku temperatura se podešava na 72 °C, što je ujedno i optimalna temperatura za aktivnost *Taq* polimeraze. *Taq* polimeraza dodaje nukleotide na 3' kraj početnice po principu komplementarnosti s lancom kalupom. Trećim korakom završava se jedan ciklus PCR metode, kojom iz jedne dvolančane molekule DNA nastaju dvije dvolančane molekule DNA. Svakim sljedećim ciklusom dolazi do eksponencijalnog povećanja broja kopija DNA molekule.

Lančana reakcija polimeraze (PCR)



Slika 9. Shematski prikaz lančane reakcije polimeraze (PCR)

(<https://microbiologyinfo.com/?s=pcr>, pristupljeno 11.5.2018.)

3.2.2. Umnažanje *CCW12XR* fragmenta iz *pRS425Ccw12XR* plazmida primjenom PCR-a

CCW12XR fragment iz *pRS425Ccw12XR* plazmida umnožen je primjenom PCR metode kroz tri ciklusa s različitim brojem ponavljanja te odgovarajućim temperaturnim i vremenskim parametrima. Uvjeti provođenja PCR reakcije za umnažanje prikazani su u tablici 3, dok je reakcijska smjesa za PCR prikazana u tablici 4.

Tablica 3. Način provođenja PCR reakcije za umnažanje

Ciklus	Broj ponavljanja ciklusa	Faza PCR-a	T/°C	Vrijeme provođenja/ min
1	1	denaturacija	95	5
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	46	1,5
		sinteza DNA	72	1,5
2	4	denaturacija	95	0,75
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	46	1,5
		sinteza DNA	72	1,5
3	30	denaturacija	95	0,75
		komplementarno sparivanje početnica s kalupom	65	1,5
		sinteza DNA	72	1,5

Tablica 4. Reakcijska smjesa za PCR

Komponenta PCR smjese	Volumen/μL
<i>pRS425Ccw12XR</i> plazmid	0,5
primer F	2
primer R	2
pufer za <i>Taq</i> polimerazu	5
smjesa dNTP nukleotida	1
<i>Taq</i> polimeraza	1
sterilna voda	38,5

CCW12XR fragment, dobiven PCR metodom, potom je provjeren elektroforezom u agaroznom gelu nakon čega je izoliran i pročišćen iz gela.

3.2.3. Pročišćavanje fragmenta umnoženog PCR metodom

Pročišćavanje umnoženog fragmenta provedeno je pomoću kita za pročišćavanje PCR produkta prema uputama proizvođača (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up; Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

3.2.4. DNA elektroforeza u agaroznom gelu

DNA elektroforeza provedena je u 1% agaroznom gelu dobivenim otapanjem agaroze u TAE puferu (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/L EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu od 80 V u trajanju od 45 minuta. Po završetku, agarozni gel je uronjen u otopinu etidij-bromida (1 mg/mL) na 15 minuta nakon čega su vrpce DNA fragmenata vizualizirane pomoću transiluminatora (Hoefer, Macrovue UVis-20).

3.2.5. Izolacija DNA iz agaroznog gela

Izolacija umnoženog fragmenta *CCW12XR* iz agaroznog gela provedena je pomoću kita za izolaciju DNA iz gela (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up; Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

3.2.6. Određivanje koncentracije fragmenta pomoću Qubit-a

Koncentracija izoliranog DNA fragmenta određena je pomoću fluorometra Qubit 4. Qubit se koristi za brzo i precizno određivanje koncentracije DNA, RNA, mikro RNA, slobodnih nukleotida i/ili proteina (slika 10). Uređaj odlikuje znatno veća osjetljivost od metoda zasnovanih na UV apsorpciji zbog čega predstavlja prvi izbor prilikom određivanja nižih koncentracija navedenih biomolekula u smjesi. Prije mjerenja koncentracije ciljane biomolekule potrebno je pripremiti standarde u svrhu kalibracije uređaja. Dodatkom fluorescentne boje i pufera u uzorak s biomolekulom od interesa – DNA, RNA ili protein, dolazi do specifičnog povezivanja, što rezultira pojavom fluorescencije. Ovisno o stupnju fluorescencije, odnosno količini fluorescentne boje povezane sa biomolekulama, uređaj daje podatke o koncentraciji ispitivane biomolekule u uzorku. U eksperimentu je koncentracija DNA određivana pomoću kita Qubit™ 4 Quantitation Starter Kit (ThermoFischer, Waltham ,MA, SAD) prema uputama proizvođača.



Slika 10 . Fluorometar Qubit

(<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33226>, pristupljeno 23.6. 2018.)

3.2.7. TA ligacija *CCW12XR* fragmenta s lineariziranim plazmidom pGEM®-T Easy

Nakon određivanja koncentracije fragmenta, provedena je ligacija *CCW12XR* PCR fragmenta s lineariziranim plazmidom pGEM®-T Easy. Pritom je molarni omjer koncentracija fragmenta i plazmida bio 3:1. Volumen PCR fragmenta potrebnog za ligaciju izračunat je preko sljedećih formula:

$$m(\text{PCR fragment}) = \frac{m(\text{vektor, ng}) \times \text{duljina (PCR fragment, kb)}}{\text{duljina (vektor, kb)}} \times \text{omjer fragment: vektor}$$

$$V(\text{PCR fragment}) = \frac{m(\text{PCR fragment})}{\gamma(\text{PCR fragment})}$$

Sastav ligacijske smjese ukupnog volumena 10 µL prikazan je u tablici 5. Smjesa je inkubirana preko noći na 4 °C.

Tablica 5. Sastav TA ligacijske smjese

Komponenta TA ligacijske smjese	Volumen/ μL
pGEM®-T Easy plazmid	1
CCW12XR PCR fragment	0,6
T4 DNA ligaza	1
pufer za T4 DNA ligazu	5
sterilna voda	2,4

3.2.8. Transformacija kompetentnih stanica bakterije *Escherichia coli*

U 50 μL suspenzije kompetentnih stanica *E. coli* DH5 α doda se 10 μL DNA, odnosno produkta TA ligacije, nakon čega se smjesa inkubira 30 minuta na ledu. Nakon toga se smjesa inkubira 20 sekundi na temperaturi od 42 °C („heat-shock“) te se ponovno vraća u led na 2 minute. Potom se suspenziji doda 950 μL termostatisane tekuće LB podloge te se smjesa stavlja na jednosatnu inkubaciju na 37 °C. Po 200 μL transformiranih stanica nacijepi se na krute LB ploče s ampicilinom i inkubira preko noći na 37 °C.

3.2.9. Izolacija plazmidne DNA iz stanica bakterije *Escherichia coli*

Izolacija plazmida provedena je iz 4 mL suspenzije stanica *E. coli* uzgojenih preko noći na 37 °C u tekućoj LB podlozi s ampicilinom pomoću kita NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača.

3.2.10. Cijepanje DNA restrikcijskim enzimima

Cijepanja DNA provedena su restrikcijskim enzimima BamHI i EcoRV, dok je za restrikciju DNA u svrhu izolacije CCW12XR fragmenta korišten restrikcijski enzim SapI. Svi enzimi su korišteni prema uputama proizvođača („New England Biolabs“ Ipswich, MA, SAD). Sastav restrikcijske smjese prikazan je u tablici 6, dok je sastav restrikcijske smjese za izrezivanje CCW12XR fragmenta iz TA-Ccw12XR plazmida prikazan u tablici 7.

Tablica 6. Sastav restrikcijske smjese

Komponenta restrikcijske smjese	Volumen/ μL
TA-Ccw12XR plazmid	5
BamHI enzim	0,5
EcoRV enzim	0,5
pufer B za restrikcijske enzime	1
sterilna voda	3

Tablica 7. Sastav restrikcijske smjese za izrezivanje *CCW12XR* fragmenta iz TA-Ccw12XR plazmida

Komponente restrikcijske smjese	Volumen/ μL
TA-Ccw12XR plazmid	5,3
SapI enzim	1
pufer za restrikcijski enzim SapI	2
sterilna voda	11,7

3.2.11. Ligacija *CCW12XR* fragmenta s plazmidom pBSY3Z

Ligacijska smjesa ukupnog volumena 20 μL sastojala se od 50 ng lineariziranog plazmida pBSY3Z (prethodno pripremljenog restrikcijom s enzimom SapI) i odgovarajuće mase *CCW12XR* fragmenta (prethodno pripremljenog restrikcijom s enzimom SapI). U ligaciji je korišten molarni omjer plazmida i fragmenta 1:1. Smjesa je inkubirana 2 sata na temperaturi od 22 °C, a zatim 10 minuta na temperaturi od 65 °C. Sastav ligacijske smjese prikazan je u tablici 8.

Tablica 8. Sastav ligacijske smjese

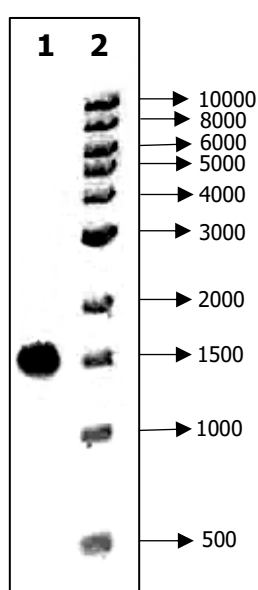
Komponenta ligacijske smjese	Volumen/ μL
linearizirani plazmid pBSY3Z	5
<i>CCW12XR</i> fragment	5,5
T4 DNA ligaza	1
pufer za T4 DNA ligazu	2
sterilna voda	6,5

Nakon provedene ligacije, kompetentne stanice *E.coli* DH5 α transformirane su ligacijskom smjesom te nacijepljene prvo na čvrstu, a potom precijepljene i na tekuću LB podlogu sa zeocinom. Iz transformiranih stanica izoliran je plazmid pomoću kita NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). Izolirani plazmid podvrgnut je cijepanju s restrikcijskim enzimima BamHI, EcoRV, PvuII i SacI, nakon čega je duljina fragmenata dobivenih restrikcijom provjerena pomoću DNA elektroforeze na agaroznom gelu i uspoređena s vrijednostima duljine fragmenata dobivenim računalnim programom.

4. REZULTATI

4.1. Kloniranje *CCW12XR* fragmenta primjenom PCR metode

PCR metodom uz uporabu vanjskih početnica, tj. primera, Ccw12XR Pichia F i Ccw12XR Pichia R, pri reakcijskim uvjetima prikazanim u tablici 3, umnožen je *CCW12XR* fragment iz plazmida pRS425Ccw12XR. Duljina fragmenta dobivenog PCR metodom, iskazana u parovima baza (pb), provjerena je DNA elektroforezom u 1% agaroznom gelu kao što je prikazano na slici 11. Iz slike 11 je vidljivo da duljina dobivenog fragmenta odgovara očekivanoj vrijednosti duljine *CCW12XR* fragmenta (1516 pb) što ukazuje na uspješno provedenu reakciju umnažanja *CCW12XR* fragmenta primjenom PCR metode.

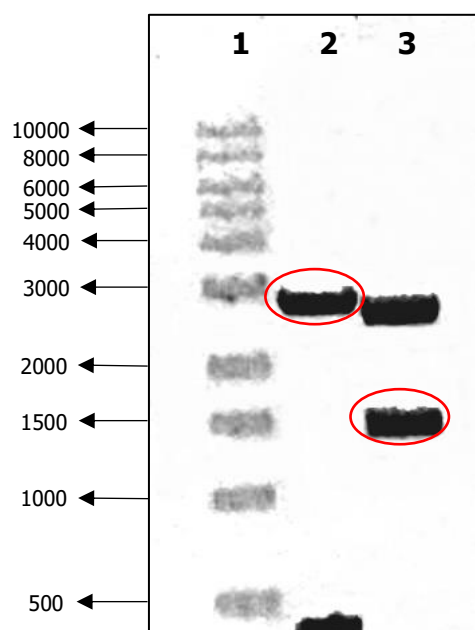


Slika 11. Analiza duljine fragmenta dobivenog PCR metodom. Uzorci: 1. *CCW12XR* fragment (1516 pb); 2. standard – DNA ladder 1 kb

4.2. Restrikcija pGEM®-T Easy plazmida i linearizacija pBSY3Z plazmida

CCW12XR fragment nakon umnažanja PCR metodom ligiran je postupkom TA ligacije u pGEM®-T Easy plazmid. Dobivenom ligacijskom smjesom transformirane su kompetentne stanice *E. coli*. Nakon umnažanja plazmida unutar kompetentnih stanica, plazmidi su izolirani iz transformiranih stanica pomoću kita za izolaciju NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prema uputama proizvođača. Budući da pGEM®-T Easy plazmid za razliku od pBSY3Z plazmida ne sadrži ishodište za replikaciju u kvascu *Pichia pastoris*, za uspješnu transformaciju kvasca potrebno je konstruirati plazmid koji će imati integriran *CCW12XR* fragment unutar pBSY3Z plazmida. Restrikcijским enzimom SapI omogućeno je

izoliranje *CCW12XR* fragmenta iz pGEM®-T Easy plazmida kao i linearizacija pBSY3Z plazmida što je preduvjet za uspješnu ligaciju fragmenata. Restrikcija pGEM®-T Easy plazmida, odnosno linearizacija pBSY3Z plazmida provedena je prema uputama proizvođača, a uspješnost restrikcije je provjerena DNA gel elektroforezom u 1% agaroznom gelu što je prikazano na slici 12.

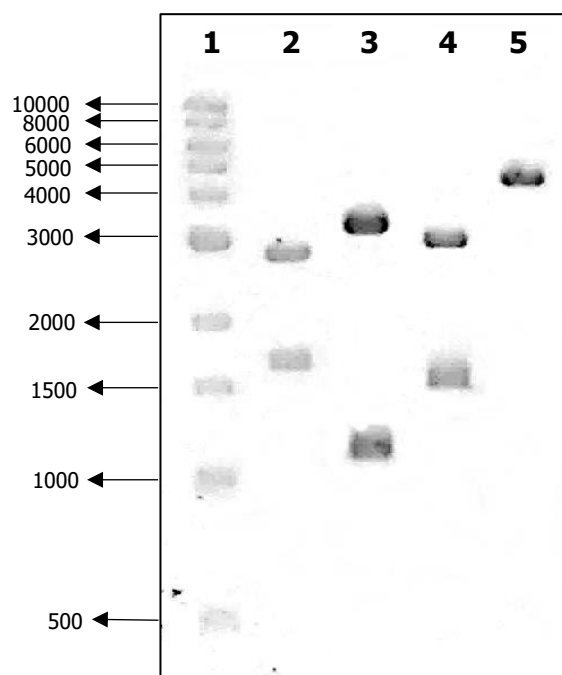


Slika 12. Analiza duljine fragmenata dobivenih restrikcijom sa SapI restriksijskim enzimom. Fragmenti izolirani za sljedeći stupanj ligacije su zaokruženi crveno. Uzorci: 1. standard – DNA ladder 1 kb; 2. pBSY3Z (gornja vrpca 2945 pb; donja vrpca 433 pb); 3. pGEM®-T Easy Ccw12XR (gornja vrpca –plazmid bez *CCW12XR* fragmenta (3023 pb); donja vrpca – *CCW12XR* fragment (1493 pb)

Vidljivo je da duljina fragmenata na slici 12 odgovara očekivanoj vrijednosti njihovih duljina nakon restrikcije s enzimom SapI što ukazuje na uspješan proces restrikcije kao i na ispravan položaj restriksijskih mjesta u plazmidima.

4.3. Izolacija *CCW12XR* fragmenta i fragmenta *pBSY3Z* plazmida iz agaroznog gela i njihova ligacija u plazmidni vektor pogodan za transformaciju kvasca *Pichia pastoris*

Izolacija fragmenata (zaokruženih crveno na slici 12) iz agaroznog gela provedena je pomoću kita za izolaciju DNA iz gela i pročišćavanje fragmenata umnoženih PCR-om (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije, *CCW12XR* fragment i fragment *pBSY3Z* plazmida ligirani su u plazmid pogodan za transformaciju kvasca *Pichia pastoris*. Ligacijskom smjesom su potom transformirane kompetentne stanice *E. coli* u svrhu dobivanja veće količine konstruiranog vektorskog plazmida postupkom opisanom u poglavlju Materijali i metode. Nakon uzgoja, iz suspenzije transformiranih stanica izoliran je vektorski plazmid uporabom kita za izolaciju plazmida (NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)) prema uputama proizvođača. Izolirani plazmid podvrgnut je restrikcijskoj provjeri uspješnosti ligacije uporabom restrikcijskih enzima BamHI, EcoRV, PvuII i SacI. Ispravnost plazmidnog vektora *pBSY3ZCcw12XR* provjerena je zatim DNA gel elektroforezom čiji su rezultati prikazani na slici 13. Očekivane duljine fragmenata nakon restrikcije plazmida s navedenim restrikcijskim enzimima prikazane su u tablici 9.



Slika 13. Analiza duljine fragmenata dobivenih restrikcijom *pBSY3ZCcw12XR* s restrikcijskim enzimima BamHI, EcoRV, PvuII i SacI. Uzorci: 1. standard – DNA ladder 1 kb; 2. *pBSY3ZCcw12XR* rezan s BamHI; 3. *pBSY3ZCcw12XR* rezan s EcoRV; 4. *pBSY3ZCcw12XR* rezan s PvuII; 5. *pBSY3ZCcw12XR* rezan s SacI

Tablica 9. Očekivane duljine fragmenata nakon restrikcije plazmida pBSY3ZCcw12XR s odabranim restrikcijskim enzimima

Restrikcijski enzim	Duljina gornje vrpce/pb	Duljina donje vrpce/pb
BamHI	2806	1632
EcoRV	3293	1145
PvuII	2944	1494
SacI	4438	-

Usporedbom očekivanih vrijednosti duljine fragmenata nakon restrikcije plazmida pBSY3ZCcw12XR s odabranim restrikcijskim enzimima (tablica 9), s duljinama fragmenata vizualiziranih u agaroznom gelu (slika 13), vidljivo je potpuno poklapanje rezultata. Time je potvrđena uspješna priprema vektorskog plazmida pBSY3ZCcw12XR što je ujedno bio i cilj ovoga rada, te je konstruirani plazmid spreman za sljedeći eksperimentalni korak - transformaciju kvasca *Pichia pastoris*.

5. RASPRAVA

Kvasac *Pichia pastoris* taksonomski se svrstava u carstvo *Fungi*. Svoju industrijsku primjenu doživio je 70-ih godina prošlog stoljeća kada se pretežito koristio za proizvodnju pojedinačnih staničnih proteina (SCP), da bi već u osamdesetim godinama postao konvencionalni mikroorganizam za proizvodnju heterolognih proteina. Svojstva lake manipulacije, rasta na podlogama jednostavnog kemijskog sastava te sposobnost rasta do visokih staničnih gustoća čine ovaj kvasac tehnološki prihvatljivijim u odnosu na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

Proizvodnja heterolognih proteina uvelike ovisi o vektorskim plazmidima koji mogu biti integrativne, epizomalne ili pak centromerne prirode. U transformaciji *Pichia pastoris* dominantna je primjena integrativnih oblika plazmida, koji se nakon linearizacije s odabranim restrikcijskim enzimom mogu integrirati u genom kvasca. Epizomalni i centromerni plazmidi manje su preferirani zbog genetičke nestabilnosti ili pak manjeg broja kopija unutar transformirane stanice. Usprkos tome, kontinuirano dolazi do razvoja novih epizomalnih i centromernih vektorskih sustava za kvasac *P. pastoris* (Nakamura i sur., 2018).

Ekspresija heterolognog proteina pod kontrolom je promotora koji predstavljaju važnu stavku u konstrukciji plazmidnih vektora. Promotori se dijele na inducibilne i konstitutivne (tablica 1) ovisno o utjecaju biotičkih i abiotičkih čimbenika na njihovu ekspresiju. Inducibilni promotor alkohol oksidaze (P_{AOX1}) najčešće je korišten inducibilni promotor u konstrukciji plazmida za *Pichia pastoris* kojeg inducira prisutnost metanola u podlozi. S druge strane, promotor gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (P_{GAP}) najčešće je korišten konstitutivni promotor kod kojeg se uz prisustvo glukoze postižu slični prinosi kao i kod P_{AOX1} .

Selekciju transformiranih kolonija kvasca *Pichia pastoris* moguće je provoditi primjenom selektivnih biljega. Selektivni biljezi najčešće su pozitivnog karaktera i uključuju prisutnost gena za rezistenciju na specifični antibiotik ili skupinu antibiotika. Uobičajeno korišteni selektivni biljezi su *Sh ble* gen koji nosi rezistenciju na bleomicinski antibiotik zeocin te *BSD* gen koji nosi rezistenciju za antibiotik blasticidin S.

Cilj ovog rada bila je konstrukcija plazmidnog vektora s integriranim genom koji kodira za heterolognu rekombinantnu ksiloza reduktazu. Metodom lančane reakcije polimeraze (PCR, *engl. Polymerase chain reaction*) umnožen je *CCW12XR* fragment iz plazmida pRS425Ccw12XR prema parametrima prikazanim u tablici 3. Umnoženom fragmentu je nakon provjere veličine gel elektroforezom i pročišćavanja izmjerena koncentracija pomoću fluorometra Qubit 4.

Iz slike 11 je vidljivo da duljina fragmenta odgovara očekivanim vrijednostima duljine *CCW12XR* fragmenta (1516 pb) što je indicacija uspješno provedenog umnažanja. *CCW12XR* fragment zatim je TA ligacijom ligiran u plazmidni vektor pGEM®-T Easy. Produktom TA ligacije transformirane su kompetentne stanice *Escherichia coli* koje su naciepljene na LB podloge s ampicilinom i inkubirane na temperaturi od 37 °C. Iz poraslih kolonija izolirani su plazmidi te je uspješnost ligacije provjerena cijepanjem izoliranih plazmida restrikcijskim enzimima BamHI i EcoRV, dok je za restrikciju plazmida u svrhu izolacije *CCW12XR* fragmenta iz dobivenog plazmida korišten restrikcijski enzim SapI. SapI restrikcijski enzim korišten je i u svrhu pripreme dijela pBSY3Z plazmida za ligaciju u konačni vektor. Restrikcijom sa SapI enzimom dobiveni su fragmenti očekivanih duljina podesni za proces ligacije (slika 12). Dio plazmida pBSY3Z i *CCW12XR* fragment ligirani su u molarnom omjeru 1:1 unutar ligacijske smjese čiji je sastav prikazan u tablici 8. Konstruirani plazmidni vektor umnožen je u kompetitivnim stanicama *Escherichia coli* koje su naciepljene na LB podloge sa zeocinom budući da pBSY3Z u svojoj sekvenci sadrži *ZeoR* gen koji kodira za rezistentnost na antibiotik zeocin. Nakon umnažanja konstruirani vektor je izoliran i restrikcijski analiziran. Restrikcijski enzimi korišteni za analizu bili su BamHI, EcoRV, PvuII i SacI. Rezultati restrikcijske analize, prikazani na slici 13, ukazuju na podudaranje vrijednosti duljina fragmenata dobivenih restrikcijom s pretpostavljenim vrijednostima, što potvrđuje uspješnu ligaciju *CCW12XR* fragmenta u pBSY3Z plazmid, odnosno da je plazmidni vektor pBSY3ZCcw12XR pogodan za transformaciju kvasca *Pichia pastoris* uspješno konstruiran.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata eksperimentalnog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Primjenom PCR metode uspješno je amplificiran *CCW12XR* fragment iz plazmida pRS425Ccw12XR
2. Dobiveni *CCW12XR* fragment uspješno je ligiran s plazmidom pBSY3Z
3. Ispravnost konstruiranog vektorskog plazmida pBSY3ZCcw12XR provjerena je i potvrđena restrikcijskom analizom

7. LITERATURA

- Ahmad M., Hirz M., Pichler H., Schwab H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**(12): 5301 – 5317.
- Ahn J., Hong J., Lee H., Park M., Lee E., Kim C., Choi E., Jung J., Lee H. (2007) Translation elongation factor 1-alpha gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 601 – 608.
- Ahn J., Hong J., Park M., Lee H., Lee E., Kim C., Lee J., Choi E., Jung J., Lee H. (2009) Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3528 – 3534.
- Bruinenberg P.M., de Bot P.H.M., van Dijken J.P., Scheffers, W.A. (1984) NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**: 256 – 260.
- Clare J.J., Romanos M.A., Rayment F.B., Rowedder J.E., Smith M.A., Payne M.M., Sreekrishna K., Henwood C.A. (1991) Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**: 205 – 212.
- Cregg J., Tolstorukov I. (2012) *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins. United States patent US 8,222,386.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K.R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 3376 – 3385.
- Darby R.A., Cartwright S.P., Dilworth M.V., Bill R.M. (2012) Which yeast species shall I choose? *Saccharomyces cerevisiae* versus *Pichia pastoris*. *Methods in Molecular Biology* **866**: 11 – 23.
- de Almeida J.R.M., de Moraes L.M.P., Torres F.A.G. (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* **22**: 725 – 737.
- Ellis S.B., Brust P.F., Koutz P.J., Waters A.F., Harpold M.M., Gingeras T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* **5**: 1111 – 1121.

- Granstörn T.B., Izumori K., Leisola M. (2007) A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 277 – 281.
- Guilliermond A. (1920) *Zygosaccharomyces pastori*, nouvelle espece de levures copulation het'erogamique. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **36**: 203 – 11.
- Hieter P., Mann C., Snyder M., Davis R.W. (1985) Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony colour assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell* **40**: 381 – 392.
- Higgins D.R., Busser K., Comiskey J., Whittier P.S., Purcell T.J., Hoeffler J.P. (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods in molecular biology* **103**: 41 – 53.
- Inan M, Meagher M.M. (2001) Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 585 – 589.
- Kowalczykowski S.C. (2015) An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **7**: a016410.
- Lee C.C., Williams T.G., Wong D.W.S., Robertson G.H. (2005) An episomal expression vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. *Plasmid* **54**: 80 – 85.
- Li P., Sun H., Chen Z., Li Y., Zhu T. (2015) Construction of efficient xylose utilizing *Pichia pastoris* for industrial enzyme production. *Microbial Cell Factories* **14**: 22.
- Liang S., Zou C., Lin Y., Zhang X., Ye Y. (2013) Identification and characterization of P GCW14: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* **35**: 1865 – 1871.
- Menendez J., Valdes I., Cabrera N. (2003) The ICL1 gene of *Pichia pastoris*, transcriptional regulation and use of its promoter. *Yeast* **20**: 1097 – 1108.
- Morange M. (2009) What history tells us XIX. The notion of the episome. *Journal of Biosciences* **34(6)**: 845 – 848.
- Murray A.W., Szostak J. W. (1983) Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* **34**: 911 – 970.

- Nakamura Y., Nishi T., Noguchi R., Ito Y., Watanabe T., Nishiyama T., Aikawa S., Hasunuma T., Ishii J., Okubo Y., Kondo A. (2018) Construction of a new stable, autonomously replicating plasmid vector containing *Pichia pastoris* centromeric DNA. *Applied and Environmental Microbiology* doi:10.1128/AEM.02882-17.
- Oldenburg K.R., Vo K.T., Michaelis S., Paddon C. (1997) Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Research* **25**: 451 – 452.
- Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. (1983) Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Methods in Enzymology* **101**: 228 – 245.
- Phaff H., Miller M., Shifrine M. (1956) The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. *Antonie van Leeuwenhoek* **22**: 145 – 61.
- Prielhofer R., Maurer M., Klein J., Wenger J., Kiziak C., Gasser B., Mattanovich D. (2013) Induction without methanol: novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories* **12**: 5.
- Romanos M.A., Clare J.J., Beesley K.M., Rayment F.B., Ballantine S.P., Makoff A.J., Dougan G., Fairweather N.F., Charles I.G. (1991) Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin P69 from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**: 901 – 906.
- Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8(6)**: 423 – 488.
- Rothstein R. (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods in Enzymology* **194**: 281 – 301.
- Runge K.W., Wellinger R.J., Zakian V.A. (1991) Effects of excess centromeres and excess telomeres on chromosome loss rates. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 2919 – 2928.
- Shen S., Sulter G., Jeffries T.W., Cregg J.M. (1998) A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**: 93 – 102.
- Sigoillot M., Brockhoff A., Lescop E., Poirier N., Meyerhof W., Briand L. (2012) Optimization of the production of gurmarin, a sweet-taste suppressing protein, secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**: 1253 – 1263.

- Stadlmayr G., Mecklenbräuker A., Rothmüller M., Maurer M., Sauer M., Mattanovich D., Gasser B. (2010) Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. *Journal of Biotechnology* **150**: 519 – 529.
- Svetec I.K., Stafa A., Zgaga Z. (2007) Genetic side effects accompanying gene targeting in yeast: the influence of short heterologous termini. *Yeast* **24**: 637 – 652.
- Teparić R., Stuparević I., Mrša V. (2010) Incorporation of Homologous and Heterologous Proteins in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Food Technology and Biotechnology* **48**: 317 – 328.
- Tschopp J.F., Brust P.F., Cregg J.M., Stillman C.A., Gingeras T.R. (1987a) Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research* **15**: 3859 – 3876.
- Uchima C.A., Arioka M. (2012) Expression and one-step purification of recombinant proteins using an alternative episomal vector for the expression of N-tagged heterologous proteins in *Pichia pastoris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **76**: 368 – 371.
- Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V., Cregg J.M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**: 37 – 44.
- Webb S.R., Lee H. (1990) Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose fermenting yeasts. *Journal of Biotechnology* **9**: 685 – 697.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Josip Rešetar

ime i prezime studenta